เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

สุกัญญา ป้องทอง. 2539. การเปรียบเทียบการหลอมโพรโทพลาสท์ของยีสต์ด้วยวิธีอิเล็กโทร-ฟิวชัน และการใช้สารเคมี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อัญชนา จีนานุพันธ์. 2538. ระบบเครื่องหลอมเซลล์ด้วยไฟฟ้า. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Alemohammad, S.J., and Pembroke, J.T. 1990. Transformation of the coryneform bacterium *Cellulomonas flavigena* with plasmid DNA via electroporation. Biotechniques. 4(2) : 147-148.

Allen, S.P., and Blaschek, H.P. 1988. Electroporation-Induced transformation of intact cells of *clostridium perfringens*. Appl. Environ. Microbiol. 54(9) : 2322-2324

Aymerich, M.T., Hugas, M., Garriga, M., Vogel, R.F., and Monfort. J.M. 1993. Electrotransformation of meat Lactobacilli. Effect of several parameters on their efficiency of transformation. J. Appl. Bacteriol. 75 : 320-325.

Birnboim, H.C. 1983. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Methods Enzymol. 100. 243-255.

Brigidi, P., Rossi, E.D., Bertarini, M.L., Riccardi, G., and Matteuzzi, D. 1990. Genetic transformation of intact cells of *Bacillus subtilis* by electroporation. FEMS Microbiol. Lett. 67 : 135-138.

Calvin, N.M., and Hanawalt, P.C. 1988. High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. J. Bacteriol. 107 (6) : 2697-2801.

Chang, D.C. 1992. Structure and dynamic of electric field-induced membrane pore as revealed by rapid-freeying electron microscopy. In Chang, D.C., Chassy, B.M., Saunders, J.A., and Sowers, A.E. (eds.). Guide to electroporation and electrofusion. pp. 10-24. New York : Academic press.

Chassy, B.M. and Fiickinger, J.L. 1987. Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. FEMS Microbiol. Lett. 44 : 173-177.

Chassy, B.M., Mercenier, A., and Flickinger, J. 1988. Transformation of bacteria by electroporation. Trends Biotchnol. 6 : 303-309.

Chassy, B.M., Saunders, J.A., and Sowers, A.E. 1992 Pulse Generator for electrofusion and electroporation. In. Chang, D.C., Chassy, B.M., Saunders, J.A., and Sower, A.E. (eds.). Guide to electroporation and eletrofusion. pp. 555-569. New York : Academic Press.

Chernomordik, L.V. 1992. Electropore in lipid bilayer and cell membrane. In Chang, D.C., Chassy, B.M., Saunders, J.A., and Sowers, A.E. (eds.). Guide to electroporation and electrofusion. pp. 63-72. New York : Academic press.

Chu, G., Hayakawa, H., and Berg, P. 1987. Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA. Nucleic Acids Res. 15(3) : 1311-1326.

Chung, C.T., Niemela, S.L., and Miller, R.H. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli* : Transformation and storage of bacterial cell in the same solution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86 : 2172-2175.

Conchas, R.F., and Carniel, E. 1990. High efficient electroporation system for transformation of *yersinia*. Gene. 87 : 133-137.

Cruz-Rodz, A.L., and Gilmore, M.S. 1990. High efficiency introduction of plasmid DNA into glycine treated *Enterococcus faecalis* by electroporation. Mol. Gen. Genet. 224 : 152-154.

Cymbalyuk, E.S., Chernomordik, L.V., Broude, N.B., and Chizmadzhev, Yu. A. 1988. Electrostimulated transformation of *E. coli* cell pretreated by EDTA solution. FEBS Lett. 234 (1) : 203-207.

Dower, W.J. 1990. Electroporation of prokaryotic cell. United State Patent, No. 4,910,140

Dower, W.J., Miller, J.F., and Ragsdale, C.W. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acid Res. 6 (13) : 6127-6145.

Elvin, S., and Bingham, A.H.A. 1991. Electroporation-induced transformation of *Escherichia coli* : Evaluation of a square waveform pulse. Lett. Appl. Microbiol. 12 : 39-42.

Eynard, N., Sixou, S., Duran, N., and Teissie, J. 1992. Fast kenetics studies of *Escherichia coli* eletrotransformation. Eur. J. Biochem. 209 : 431-436.

Fiedler, S. and Wirth, R. 1988. Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. Anal. Biochem. 170 : 38-44.

Friesenegger, A., Fiedler, S., Devriese, L.A., and Wirth, R. 1991. Genetic transformation of various species of *Enterococcus* by electroporation. FEMS Microbiol. Lett. 79 : 323-328.

Fromm, M., Taylor, L.P., and Walbot, V. 1985. Expression of gene transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82 : 5824-5828.

Fujimoto, S., Hashimoto,H., and Ike, Y. 1991. Low cost device for electrotransformation and its application to the highly efficient transformation of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*. Plasmid. 26 : 131-135.

Hall, P.E., Anderson, S.M., Johnston, D.M., and Cannon, R.E. 1992. Transformation of *Acetobacter xylinum* with plasmid DNA by electroporation. Plasmid. 28 : 194-200.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. J. Mol. Biol. 166 : 557-580.

Hattermann, D.R., and Stacey, G. 1990. Efficient DNA transformation of *Bradyrhizobium japonicum* by electroporation. Appl. Environ. Microbiol. 56(4) : 833-836.

Hermans, J., Boschloo, J.G., and de Bont, J.A.M. 1990. Transformation of *Mycobacterium aurum* by electroporation : The use of glycine, lysozyme and isonicotinic acid hydrazide in enhancing transformation efficiency. FEMS Microbiol. Lett. 72 : 221-224.

Iwasaki, K., Uchiyama, H., Yagi, O., Kurabayashi, T., Ishizuka, K., and Takamura, Y. 1994. Transformation of *Pseudomonas putida* by electroporation. Biosci. Biotech. Biochem. 58(5) : 851-854.

Jost, B.H., Billington, S.J., and Songer, J.G. 1997. Electroporation-Mediated transformation of *Arcanobacterium pyogenes* (Actinomyces). Plasmid 38 : 135-140.

Karube, I., Tamiya, E., and Matsuoka, H. 1985. Transformation of *Saccharomyces cerevisias* spheroplasts by high electric pulse. FEBS Lett. 182 (1) : 90-94.

Katenkamp, U., Groth, I., Laplace, F., and Malke, H. 1992. Electrotransformation of the stable L-form of *Proteus mirabilis*. FEMS Microbiology Letters. 94 : 19-22.

Klebe, R.J., Harriss, J.V., sharp, Z.D., and Douglas, M.G. 1983. A geneal method for polyethylene - glycol - induced genetic transformation of bacteria and yeast. Gene. 25 : 333-341.

Knutson, J.C., and Yee D. 1987. Electroporation : Parameters affecting transfer of DNA into mammalian cells. Anal. Biochem. 164 : 44-52.

Lam, C.K., Mullan, P.O., and Eveleigh, D.E. 1993. Transformation of *Zymomonas mobilis* by electroporation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 39 : 305-308.

Liebl, W., Bayerl, A., Schein, B., Stillner, U., and Schleifer, K.H. 1989. High efficiency electroporation of intact *Corynebacterium glutamicum* cells. FEMS Microbiol. Lett. 65 : 299-304.

Maniatis, T., Fritsch, E.F, and Sambrook, J. 1982. Molcular cloning (A laboratory manual) united state : of America : cold spring Habor laboratory press.

Marciset, O., and Mollet, B. 1994. Multifractorial experimental design for optimizing transformation : Electroporation of *Streptococcus thermophilus*. Biotechnol. Bioeng. 43 : 490-496.

Masson, L., Prefontaine, G., and Brousseau, R. 1989. Transformation of *Bacillus thuringiensis* vegetative cells by electroporation. FEMS Microbiol. Lett. 60 : 273-278.

Miller, E.M., and Nickoloff, J.A. 1995. *Escherichia coli* electroransformation. In Nickoloff, J.A. (eds.). Electroporation protocol for microorganism. pp. 105-113. New Jersey : Humana press.

Miller, J.F., Dower, W.J., and Tompkins, L.S. 1988. High-voltage electroporation of bacteria : genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85 : 856-860.

Ozeki., K., Kyoya (fujie), F., Hizume, K., Kanda, A., Hamachi, M., and Nunokawa, Y. 1994. Transformation of intact *Aspergillus niger* by electroporation. Biosci.Biotech. Biochem. 58 (12) : 2224-2227.

Powell, I.B., Achen, M.G., Hillier, A.J., and Davidson, B.E. 1988. A simple and Rapid Method for genetic transformation of *lactic Streptococci* by electroporation. Appl. Environ. Microbiol. 54 (3) : 655-660.

Sabelnikov, A.G., Cymbalyuk, E.S., Gongadze, G., and Borovyagin, V.L. 1991. *Escherichia coli* membranes during etectrotransformation : an electron microscopy study. Biochimi. Biophys. Acta. 1066 : 21-28.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning : a Laboratory Manual Volume 1. 2nd. United States of America : Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sawahel, W., Sastry, G., Knight, C., and Cove, D. 1993. Development of an electro-transformation system for *Escherichia coli* DH10B. Biotechniques. 7(4) : 261-269.

Schenk, S., and Laddaga, R.A. 1992. Improved method for electroporation of *Staphylococcus aureus*. FEMS Microbiol. Lett. 94 : 133-138.

Sheng, Y., Mancino, V., and Birren, B. 1995. Transformation of *Escherichia coli* with large DNA molecules by electroporation. Nucleic Acids Res. 23(11) : 1990-1996.

Shigekawa, K., and Dower, W.J. 1988. Electroporation of eukaryotes and prokaryotes : A general approach to the introduction of macromolecules into cells. Biotechniques. 6 (8) : 742-751.

Smith, C.J., Parker, A., and Rogers, M.B. 1990. Plamid transformation of *Bacteroides spp.* by electroporation. Plasmid. 24 : 100-109.

Solioz, M., and Bienz, D. 1990. Bacterial genetics by electric shock. Trends Biochem. Sci. 15 : 175-177.

Stephenson, M. and Jarrett, P. 1991. Transformation of *Bacillus subtilis* by electroporation. Biotechniques. 5 (1) : 9-12.

Taketo, A. 1988. DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. Biochimi. Biophys. Acta. 949 : 318-324.

Taketo, A. 1989. Properties of Electroporation-Mediated DNA transfer in *Escherichia coli*. J. Biochem. 105 : 813-817.

Taylor, L.D., and Burke, Jr. W.F. 1990. Transformation of an entomopathic strain of *Bacillus sphaericus* by high voltage electroporation. FEMS Microbiol. Lett. 66 : 125-128.

Thiel, T. and POO, H. 1989. Transformation of a filamentous cyanobacterium by electroporation. J. Bacteriol. 171 (10) : 5743-5746.

Trevors, J.T., Chassy, B.M., Dower, W.J., and Blaschek, H.P. 1992. Electrotransformation of Bacteria by plasmid DNA. In Chang, D.C., Chassy, B.M., Saunders, J.A., and Sowers, A.E. (eds.). Guide to Electroporation and Electrofusion. pp. 265-281. New York : Academic press.

Tsong, T.Y. 1991. Electroporation of cell membrane. Biophys. J. 60 : 297-306.

Vehmaanpera, J. 1989. Transformation of *Bacillus amyloliquefaciens* by electroporation. FEMS Microbiol. Lett. 61 : 165-170.

Wards, B.J., and Collins, D.M. 1996. Electroporation at elevated temperatures substantially improves transformation efficiency of slow-growing mycobacteria. FEMS Microbiol. Lett. 145 : 101-105

Wirth, R., Friesenegger, A., and Fiedler, S. 1989. Transformation of various species of gram-nagative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. Mol. Gen. Genet. 216 : 175-177.

Xie, T-D., and Tsong, T.Y. 1990. Study of mechanisms of electric field-induced DNA transtection II (transfection by low-amplitude, low-frequency alternating electric fields). Biophys. J. 58 : 897-903.

Xie, T-D., Sun, L., and Tsong, T.Y. 1990. Study of mechanisms of electric field-induced DNA transfection I(DNA entry by surface binding and diffusion through membrane pores). Biophys. J. 58 : 13-19.

Zimmermann, U. 1983. Electrofusion of cells : principles and industrial potential. Trends Biotechnol. 1 (5) : 149-155.

ภาคผนวก ก
อุปกรณ์และสารเคมี

1. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

- เครื่องกำเนิดไฟฟ้า (Electrophoresis power supply) รุ่น Eps 500/400 บริษัท Phamacia Fine Chemical, Sweden
- เครื่องเขย่า (vortex) รุ่น Vortex-Genie No.2 บริษัท Scientific Industries, Inc. USA
- เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น G-25 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc. N.J. USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น KR-20000T บริษัท Kubota Corporation, Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกปริมาตรน้อย (High speed microcentrifuge) รุ่น MC-15A บริษัท Tomy Seiko Co., Ltd. Tokyo Japan
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 บริษัท Bausch & Lomb, USA
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น F13 บริษัท Horiba Ltd. Japan
- เครื่องชั่งแบบหยาบ (Electronic Balance) รุ่น FX-3000 บริษัท A&D, Japan
- เครื่องชั่งแบบละเอียด (Electronic Balance) รุ่น FX-180A บริษัท A&D , Japan
- ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) รุ่น MIR152 บริษัท Sanyo Electric Co., Ltd, Japan
- ตู้อบ (Oven) บริษัท Contherm scientific Ltd., New sealand
- ตู้อบไมโครเวฟ (Microwave oven) รุ่น MR-6650 บริษัท Hitachi, Ltd., Japan
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Autoclave) รุ่น HA-2 บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan
- แหล่งกำเนิดแสงอัลตราไวโอเลต (Transilluminator 2011 Macrovue) บริษัท LKB, Bromma, Sweden
- อ่างควบคุมอุณภูมิ (Aquatherm water bath shaker) รุ่น G-86 บริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., N.J., USA

2. สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

- กรดโบริก (Boric acid) บริษัท Carlo Erba Co., Italy
- กรดซัลฟูริค (Sulfuric acid) บริษัท Mallinckrodt Co., USA
- กรดอะซิติก (Acetic acid) บริษัท Merck, Germany
- กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) บริษัท Merck, Germany
- กลูโคส (Glucose) บริษัท Sigma , USA
- กลีเซอรอล (Glycerol) บริษับ Carlo Erba Co., Italy
- เปปโตน (Peptone) บริษัท Diffco , USA
- สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ส. เทคโนโลยีชีวภาพ ฯ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย
- เกลือไดโซเดียม อี ดี ที เอ (Na_2 EDTA) บริษัท Sigma , USA
- แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium chloride) บริษัท Carlo Erba Co., Italy
- โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) บริษัท Carlo Erba Co., Italy
- โซเดียมอะซิเตรต (Sodium acetate) บริษัท Merck , Germany
- โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium dodacyl sulfate) บริษัท BDH , England
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) บริษัท Carlo Erba Co., Italy
- โปตัสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride) บริษัท Carlo Erba Co., Italy
- คลอโรฟอร์ม (Chloroform) บริษัท Caro Erba Co., Italy
- ฟีนอล (Phenol) บริษัท Merck, Germany
- โพลีเอธีลีนไกลคอล (Polyethlene glycol) มวลโมเลกุล 4,000 บริษัท Fluka , Switzerland
- เอธานอล (Ethanol) 70% 95% และ 100 % บริษัท Carlo Erba Co., Italy
- เอทีเดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) บริษัท Sigma , USA
- แอมพิซิลลิน (Amplicillin) บริษัท Sigma , USA
- อะกาโรส (Agarose) บริษัท Sigma . USA
- ทริส (Trizma base) บริษัท Sigma , USA
- วุ้น (Agar) ตรานางเงือก ประเทศไทย

ภาคผนวก ข
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. น้ำเลี้ยงเชื้อ (Media) หรืออาหารเลี้ยงเชื้อผสมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน

1.1 LB medium โดยเตรียมในปริมาตร 1 ลิตร (L) ประกอบด้วย (ปรับ pH = 7.5 โดยใช้ NaOH หรือ HCl เจือจาง)

Bacto tryptone	10	กรัม (g)
Yeast extract	5	กรัม (g)
NaCl	10	กรัม (g)
เติมน้ำให้ครบ	1000	มิลลิลิตร (ml)

ทำให้ปราศจากเชื้อ (Autoclave) ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 แอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 5 mg/ml ปริมาตร 60 ml ประกอบด้วย

แอมพิซิลลิน (Ampicillin)	0.3	g
น้ำที่ไร้เชื้อ (sterile)	60	ml

อุปกรณ์ใส่เช่นขวด ชุดกรอง ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วนำไปกรองด้วยชุดกรอง (Filter) ที่มีเมมเบรนขนาด 0.22 ไมโครเมตร (μm)

1.3 LB medium ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 25 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร (μg/ml) ปริมาตร 5 ml ประกอบด้วย

- นำ LB medium ที่ปลอดเชื้อ (sterile) 5 ml

- เติม 25 ไมโครลิตร (μl) ของสารละลาย stock แอมพิซิลลิน ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (mg/ml)

1.4 SOC medium โดยเตรียมปริมาตร 1 L ประกอบด้วย

Bacto tryptone	20	g
Yeast extract	5	g
NaCl	0.5	g
เติมน้ำให้ได้ปริมาตร	950	ml

ละลายดีแล้วเติม 250 mM KCl (1.86 g/น้ำปริมาตร 100 ml) จำนวน 10 ml แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อ (Autoclave) ก่อนใช้เติม

- 2 M $MgCl_2$ (19 g/น้ำ 100 ml) ที่ปราศจากเชื้อ จำนวน 5 ml

- 1 M กลูโคส (Glucose) (18 g/น้ำ 100 ml) ที่ปราศจากเชื้อ จำนวน 20 ml ก็จะได้ความเข้มข้นกูลโคสในสารละลายอาหาร SOC เท่ากับ 20 mM

การทำไร้เชื้อในสารละลายกูลโคส โดยนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (Media plate)

2.1 LB Agar โดยเตรียมปริมาตร 100 ml ประกอบด้วย

- LB medium	100	ml
- วุ้น (Agar)	1.5	g

แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.2 LB Agar ที่มียาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน 50 µg/ml โดยเตรียมปริมาตร 100 ml ประกอบด้วย

- LB Agar ปริมาตร	100	ml (อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส)
- แอมพิซิลลิน (5 mg/ml)	1	ml

ภาคผนวก ค
สูตรสารละลายสำหรับการสกัดพลาสมิดโดยใช้ด่าง

1. สารละลาย 1 (I) ประกอบด้วย

กลูโคส (Glucose)	50	mM
ทริส (Tris-HCl, pH 8.0)	25	mM
EDTA, pH 8.0	10	mM

แล้วทำให้ปราศจากเชื้อ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2. สารละลาย 2 (II) ประกอบด้วย(จะต้องเตรียมเมื่อเวลาใช้ไม่มีการเตรียมเก็บไว้)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	0.2	N
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)	1	%

3. สารละลาย 3 (III) ปริมาตร 100 ml ประกอบด้วย

โซเดียมอะซีเตรต(Na CH_3COONa) ความเข้มข้น 5M	60	ml
กรดอะซีติก (Glacial acetic acid)	11.5	ml
น้ำ	28.5	ml

แล้วทำให้ปราศจากเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลาย ฟีนอล (Phenol) ที่อิ่มตัวด้วย TE buffer โดย

ทำการหลอมฟีนอลแล้วนำไปผสมกับสารละลาย TE buffer ในอัตราส่วน 1/1 (V/V) เมื่อผสมกันแล้วต้องเขย่าให้เข้ากันมากที่สุดแล้วตั้งไว้ให้แยกชั้นเป็น 2 ชั้น นำสารละลายฟีนอลซึ่งอยู่ด้านล่างไปใช้งานต่อไป สารละลายนี้สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. สารละลายฟีนอล/คลอโรฟอร์ม (chloroform) โดย

ทำการนำสารละลายฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยสารละลาย TE buffer มาผสมกับคลอโรฟอร์ม ในอัตราส่วน 1/1 (V/V)

6. สารละลาย 1 M Tris-HCl, pH 8.0 ปริมาตร 10 ml ประกอบด้วย

Tris base	1.21	g
น้ำ	8	ml
HCl เข้มข้น	0.42	ml

ปรับ pH เท่ากับ 8 โดยใช้ HCl หรือ NaOH เจือจาง แล้วเติมน้ำให้ครบ 10 ml แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. สารละลาย 0.5 M EDTA (pH 8.0) ปริมาตร 10 ml ประกอบด้วย

Disodium Ethylene Diamine tetraacetate $2H_2O$ (EDTA)	1.861	g
น้ำ	8	ml
ปรับ pH = 8 โดยเติม NaOH	0.2	g
เติมน้ำให้ครบ	10	ml

ทำให้ปราศจากเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. TE buffer ผสมสารละลายต่อไปนี้ในหลอดไร้เชื้อ แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml ประกอบด้วย

1 M Tris-HCl, pH 8.0	0.1	ml
0.5 M EDTA, pH 8.0	0.02	ml
เติมน้ำที่ปราศจากเชื้อให้ครบ	10	ml

9. เอธานอล ความเข้มข้น 70% ปริมาตร 100 ml ประกอบด้วย

เอธานอล ความเข้มข้น 100%	70	ml
น้ำ	30	ml

10. RNase 0.5 mg/ml โดยผสมสารละลายต่าง ๆ ในหลอดแก้วที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ประกอบด้วย

RNase	0.5	mg
น้ำที่ทำให้ปราศจากเชื้อ	1	ml

11. อะกาโรส (Agarose) ความเข้มข้น 0.7% ปริมาตร 100 ml ประกอบด้วย

อะกาโรส (Agarose)	0.7	g
TB buffer	100	ml

ทำให้อะกาโรสละลายโดยการต้ม

12. Tris-borate buffer (TB Buffer) ปริมาตร 1 L ประกอบด้วย

Tris base	10.8	g
Boric acid	5.5	g
Na_2EDTA	0.93	g
เติมน้ำให้ครบ	1000	ml

13. Tracking dye ปริมาตร 10 ml ประกอบด้วย

bromophenol blue	2.5	mg
Ficoll 400	4	g
SDS	50	mg
แล้วเติมน้ำให้ครบ	10	ml

14. DNA Staining solution (Ethidium bromide 2.5 µg/ml) ปริมาตร 1L ประกอบด้วย

Ethidium bromide	2.5	mg
น้ำ (H_2O)	1	L

ภาคผนวก ง
สูตรสารละลายที่ใช้ในกระบวนการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีทางเคมีและอิเล็กโทรพอเรชัน

1. สารละลายที่ใช้ในกระบวนการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีทางเคมี ($CaCl_2$)

1.1 สารละลาย 0.1 M $CaCl_2$ ปริมาตร 10 ml ประกอบด้วย

$CaCl_2$ $2H_2O$	0.147	g
ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้เท่ากับ	10	ml

แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

1.2 สารละลาย 10 mM Tris-HCl , pH 8.0, 50 mM $CaCl_2$ ปริมาตร 10 ml โดยผสมสารละลายต่าง ๆ ในหลอดแก้วไร้เชื้อ ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 10 ml โดยใช้น้ำไร้เชื้อ

1 M Tris-HCl, pH 8.0	0.1	ml
0.1M $CaCl_2$	5	ml

2. สารละลายที่ใช้ในกระบวนการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน สารละลายที่เตรียมได้ทำให้ปราศจากเชื้อ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส , 15 นาที มีดังหัวข้อย่อยดังต่อไปนี้

2.1 การเตรียมสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 500 mM

โดยชั่ง $CaCl_2$	11.099	g
H_2O	200	ml

2.2 การเตรียมสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 1 M

โดยชั่ง $CaCl_2$	11.099	g
H_2O	100	ml

2.3 การเตรียมสารละลาย $CaCl_2$ ความเข้มข้น 2 M

โดยชั่ง $CaCl_2$	22.198	g
H_2O	100	ml

2.4 PEG4000 (10 และ 30%) ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1 M ปริมาตร 10 ml

โดยเตรียมสารละลายดังตาราง

Solution (10ml)	PEG4000 (g)	$CaCl_2$ 500 mM (ml)	$CaCl_2$ 2 M (ml)	น้ำ (ml)
1 PEG4000 (30%)	3	-	-	10
2 PEG4000 (30%) $CaCl_2$ 50 mM	3	1	-	9
3 PEG4000 (30%) $CaCl_2$ 100 mM	3	2	-	8
4 PEG4000 (30%) $CaCl_2$ 500 mM	3	-	2.5	7.5
5 PEG4000 (30%) $CaCl_2$ 1000 mM	3	-	5	5
6 PEG4000 (10%)	1	-	-	10
7 PEG4000 (10%) $CaCl_2$ 50 mM	1	1	-	9
8 PEG4000 (10%) $CaCl_2$ 100 mM	1	2	-	8
9 PEG4000 (10%) $CaCl_2$ 500 mM	1	-	2.5	7.5
10 PEG4000 (10%) $CaCl_2$ 1000 mM	1	-	5	5

ทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.5 สารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จากกลีเซอรอล 100% ปริมาตร 10 ml เตรียมได้ดังตาราง

Solution (10 ml)	กลีเซอรอล (ml)	น้ำ (ml)
1. กลีเซอรอล 10%	1	9
2. กลีเซอรอล 20%	2	8
3. กลีเซอรอล 30%	3	7
4. กลีเซอรอล 40%	4	6
5. กลีเซอรอล 50%	5	5
6. กลีเซอรอล 60%	6	4
7. กลีเซอรอล 70%	7	3
8. กลีเซอรอล 80%	8	2
9. กลีเซอรอล 90%	9	1
10. กลีเซอรอล 100%	10	-

2.6 สารละลายกลีเซอรอล 80% ที่มีความเข้มข้นของ $CaCl_2$ เท่ากับ 0-100 mM ปริมาตร 10 ml เตรียมได้ดังตาราง

Solution (1 ml)	Glycerol 80% (µl)	$CaCl_2$ 1M (µl)	H_2O (µl)
1. Glycerol 80% $CaCl_2$ 1 mM	800	1	199
2. Glycerol 80% $CaCl_2$ 3 mM	800	3	197
3. Glycerol 80% $CaCl_2$ 5 mM	800	5	195
4. Glycerol 80% $CaCl_2$ 7 mM	800	7	193
5. Glycerol 80% $CaCl_2$ 9 mM	800	9	191
6. Glycerol 80% $CaCl_2$ 10 mM	800	10	190
7. Glycerol 80% $CaCl_2$ 30 mM	800	30	170
8. Glycerol 80% $CaCl_2$ 50 mM	800	50	150
9. Glycerol 80% $CaCl_2$ 70 mM	800	70	130
10. Glycerol 80% $CaCl_2$ 90 mM	800	90	110
11. Glycerol 80% $CaCl_2$ 100 mM	800	100	100

เมื่อเตรียมสารละลายในหัวข้อ 2.5 - 2.6 เสร็จแล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก จ
แบคทีเรียและพลาสมิด

แบคทีเรีย และพลาสมิดที่ใช้ในการวิจัย

1. จุลินทรีย์ *E. coli* HB101 มี Genetic marker ดังนี้

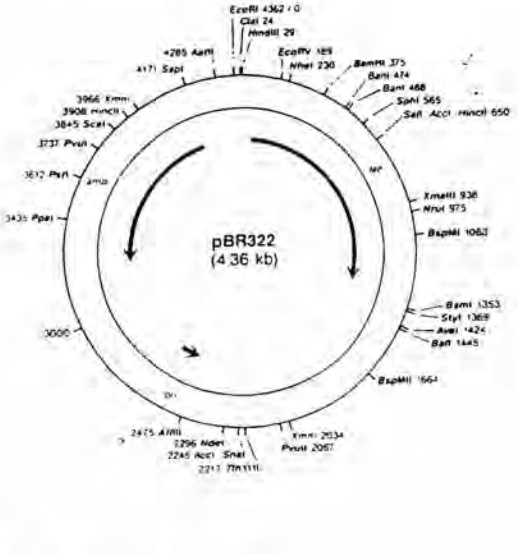
F' hsd S20 (r_B , M_B), sup E44, ara-14,

gal k-2, lac Y1, pro A2, rps L20 (str^R), xyl-5,

mtl-1 λ', rac A13

2. พลาสมิดได้แก่

2.1 พลาสมิด pBR322 - เป็นพลาสมิดที่ประกอบด้วยยีนต้านยาปฏิชีวนะ 2 ชนิด คือ แอมพิซิลลินและเตตตร้าซัยคลิน และมีตำแหน่งตัดจำเพาะสำหรับสอดใส่ดีเอ็นเอเป้าหมายภายในยีนทั้งสองนั้น การเลือกโดยดูจากคุณสมบัติการต้านยาปฏิชีวนะหนึ่งในสองนั้น



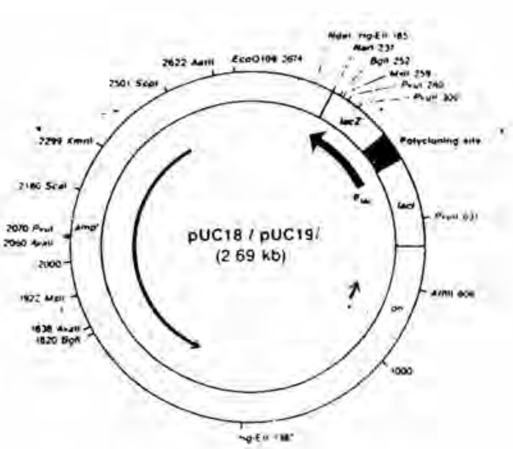
รูปพลาสมิด pBR322

ORI - จุดตั้งต้นการจำลองตัวเอง

amp^r - ยีนต้านยาแอมพิซิลลิน

tet^r - ยีนต้านยาเตตตร้าซัยคลิน

2.2 พลาสมิด pUC18 - เป็นพลาสมิดที่มียีนจาก lac operon บนโมเลกุล ยีนดังกล่าวควบคุมการสร้างเป๊ปไทด์ชนิดอัลฟา (α-peptide) ของเอนไซม์ β-galactosidase ซึ่งหากใช้ร่วมกับเซลล์เจ้าบ้านที่ผลิตส่วนที่เหลือของเอนไซม์ดังกล่าว จะทำให้ได้เอนไซม์สมบูรณ์ซึ่งสามารถย่อยสารเคมี ชื่อ X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3 Indolyl-D-Galactoside) เกิดเป็นผลิตภัณฑ์สีน้ำเงิน สามารถกระตุ้นให้ยีนดังกล่าวสร้างเป๊ปไทด์อัลฟามากขึ้น โดยการเติม IPTG (Isopropylthio-D-Galactoside) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย การเลือกโดยดูจากคุณสมบัติการต้านยาแอมพิซิลลิน หรือดูจากสีโดยถ้าแทรกยีนบริเวณควบคุมการสร้างเป๊ปไทด์อัลฟา ถ้าหากสอดยีนเป้าหมายลงไปที่ตำแหน่งดังกล่าวก็จะไม่มีเอนไซม์ β-Galactosidase โคโลนี ของแบคทีเรียที่มี DNA สายผสมจะปรากฏเป็นโคโลนีสีขาว ส่วนโคโลนีแบคทีเรียที่มีแต่พลาสมิดจะเป็นสีน้ำเงิน



รูปพลาสมิด pUC18

ORI - จุดตั้งต้นการจำลองตัว

amp^r - ยีนต้านยาแอมพิซิลลิน

lacZ' - ยีนสร้างเป๊ปไทด์อัลฟา

lacI - ยีนที่สร้าง lac Repressor

Plac - โปรโมเตอร์

Polycloning site - ตำแหน่งโคลนหลากหลาย

ภาคผนวก ฉ
การทดลอง Electroporation โดยใช้เครื่องจากบริษัท Bio Rad

การทรานสฟอร์เมชันโดยใช้วิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (Electroporation) กับเครื่องอิเล็กโทรพอเรชันของบริษัท Bio Rad ให้กำเนิดคลื่นรูปพัลส์ที่ลดลง แบบเอ็กซ์โพเนนเชียล

โดยทั่วไป การทรานสฟอร์เมชันโดยใช้วิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* สายพันธุ์ต่าง ๆ กับพลาสมิด pUC18 ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันประมาณ 10^9 x 10^{10} t/µg DNA (Dower et al., 1988; Hanawalt and calvin, (1988)) ในงานวิจัยนี้จึงทำการทดลอง เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ระหว่าง *E. coli* HB101 กับ พลาสมิด pUC18 ปริมาณ 6.32 ng กับ งานวิจัยของนักวิทยาศาสตร์ท่านอื่น ๆ พร้อมกันนี้ได้ทำการแปรปัจจัยความเข้มข้นของเซลล์พร้อมทั้งแปรสนามไฟฟ้าที่ความเข้ม 6 และ 12 kV/cm , เวลา 5 ms, 1 pulse ได้ผลการทดลองดังตาราง

ตารางแสดงประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชันระหว่าง *E. coli* HB101 กับพลาสมิด pUC18 ปริมาณ 6.32 ng ที่ความเข้มสนามไฟฟ้าและความเข้มข้นเซลล์ต่าง ๆ กัน

Stock (50 µl)	E (kV/cm)	จำนวนโคโลนี (100 µl)	T.E. (x10^5 t/µg DNA)
S1	6	8	0.06
S2	6	11	0.09
S3	6	29	0.2
S1	12.5	31	0.2
S2	12.5	226	1.8
S3	12.5	69	0.5

โดย S1 = *E. coli* HB101 โดยไม่เจือจาง

S2 = *E. coli* HB101 (500µl) + กลีเซอรอล ความเข้มข้น 30% (500µl) = 1:1

S3 = *E. coli* HB101 (100µl) + กลีเซอรอล ความเข้มข้น 30% (500µl) = 1:5

จากผลการทดลองในตารางพบว่า ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันที่สนามไฟฟ้าความเข้ม 12.5 kV/cm รวมกับอัตราส่วนการเจือจางที่ S2 (อัตราส่วนการเจือจางระหว่างปริมาตรเซลล์ : ปริมาตรกีลเซอรอล เท่ากับ 1 : 1) เท่ากับ 1.8 x 10^5 t/μg DNA
เป็นประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันที่ดีที่สุดในการทดลองครั้งนี้

เมื่อพิจารณาผลการทดลองจากตาราง สนามไฟฟ้าความเข้ม 12.5 kV/cm ให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันสูงกว่าการใช้สนามไฟฟ้าความเข้ม 6 kV/cm ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการใช้สนามไฟฟ้าความเข้ม 12.5 kV/cm, 5 ms. ของ Dower และคณะในปี 1988 แต่ที่ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันของการทดลองนี้ได้ประมาณ 10^5 t/μg DNA เนื่องมาจากเกิดประกายไฟฟ้า (arcing) ภาวะ S1 กับสนามไฟฟ้าความเข้ม 12.5 kV/cm ทำให้เซลล์ *E. coli* ตายไป ทำให้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันลดลง จาก 10^9 - 10^{10} t/μg DNA เหลือเท่ากับ 10^5 t/μg DNA จึงได้แก้ปัญหานี้โดยการเจือจางเซลล์ เป็น S2 และ S3 แล้วใช้สนามไฟฟ้าความเข้ม 12.5 kv/cm พบว่าไม่เกิดการ arcing แต่ว่าประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันก็จะลดลงเนื่องจากจำนวนเซลล์ถูกเจือจางลงไป การเกิดประกายไฟฟ้านี้เกิดจากการมีเกลือหรือความหนาแน่นเซลล์มากเกินไปในสารละลายเซล์ แนวทางแก้ไข

1. ต้องทำการล้างเกลือที่ปนเปื้อนในเซลล์ออกไปอีก เพื่อจะได้ไม่เกิดการ arcing
2. ลดปริมาตรเซลล์ที่ใส่ใน chamber เพื่อจะได้ไม่เกิดการ arcing
3. เจือจางเซลล์ตามการทดลองนี้ ทำให้ความเข้มข้นของเกลือลดลงเพื่อจะได้ไม่เกิดการ arcing

ค่าต่าง ๆ ที่ตั้งไว้ที่เครื่อง Electroporation (Bio Rad)

ความต่างศักย์ไฟฟ้าเท่ากับ	1200	และ 2500	V
ความต้านทาน	200		โอห์ม
ความจุไฟฟ้า	25		μF
ระยะห่างระหว่างขั้ว	0.2		cm

สรุป

ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันโดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน ภาวะที่เหมาะสมคือ สนามไฟฟ้าความเข้ม 12.5 kV/cm เวลา 5 ms อัตราการเจือจางปริมาตรเซล์ต่อปริมาตรกีลเซอรอลเท่ากับ 1:1 (S2) ได้ประสิทธิภาพการทรานสฟอร์เมชันเท่ากับ 1.8 x 10^5 t/μg DNA

ประวัติผู้เขียน

นายวรพันธ์ บุญชัย เกิดวันที่ 3 ตุลาคม พ.ศ. 2513 ที่จังหวัดตรัง สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตบางเขน เมื่อปีการศึกษา 2536 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2537